



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



Otimização de parâmetros para extração de compostos fenólicos da torta de noz-pecã

Autor: Bernardo Luvison Fontana

Orientadora: Júlia Ribeiro Sarkis

Porto Alegre, Novembro de 2018

Sumário

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica	3
2.1	<i>Noz-pecã</i>	3
2.2	<i>Compostos Fenólicos</i>	4
2.3	<i>Extração Sólido-Líquido</i>	6
3	Metodologia	8
3.1	<i>Material Utilizado</i>	8
3.2	<i>Análise de Estabilidade</i>	8
3.3	<i>Planejamento Fatorial dos Experimentos</i>	9
3.4	<i>Extração dos Compostos Fenólicos</i>	11
3.5	<i>Análise de Fenólicos e Proteínas</i>	13
4	Resultados	17
4.1	<i>Teste de Estabilidade</i>	17
4.2	<i>Resultados da Extração</i>	17
4.3	<i>Análise dos Compostos Fenólicos</i>	18
4.4	<i>Análise de Proteínas</i>	21
4.5	<i>Ponto Ótimo de Extração</i>	23
5	Conclusões	25

Resumo

Nas últimas décadas, com a preocupação cada vez maior com o meio-ambiente e a redução dos impactos ambientais da indústria, busca-se o reaproveitamento de resíduos e a extração de compostos de alto valor agregado através de novas alternativas. A torta de noz-pecã é um subproduto da indústria de óleo e se caracteriza por ser uma excelente fonte de compostos fenólicos, substâncias com características importantes que pode ser utilizado como conservante natural de alimentos ou auxiliar na saúde como antioxidante natural. O presente trabalho buscou obter as condições ótimas de temperatura e composição do solvente etanol/água da extração sólido-líquido de compostos fenólicos da torta de noz-pecã. Os resultados encontrados apontam que apenas a composição do solvente apresenta significância nos parâmetros linear e quadráticos, a temperatura se torna importante apenas no efeito linear conjunto com o solvente. O ponto ótimo para extração de fenólicos obtido foi de 57% de etanol no solvente em uma temperatura de 25 °C a 35°C.

Abstract

In the last decades, with the increasing preoccupation with the environment and the reduction of environmental impacts from industry, the reutilization of residue and the extraction of high value-added compounds through new alternatives is a practice that is sought in all fronts. Pecan-nut cake is a sub-product of the oil industry and is characterized by being an excellent source of phenolic compounds, substances with important characteristics that can be utilized as a natural food preservative or as health auxiliary as a natural antioxidant. The present work sought to obtain the optimal conditions of temperature and composition of ethanol/water solvent in the solid-liquid extraction of phenolic compounds of pecan-nut cake. The results point that only the solvent composition is significant for the linear and quadratic parameters, the temperature only becomes important in the joined linear effect with the solvent. The optimum point of phenolic extraction is 57% ethanol in solvent at 25°C.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura genérica de um flavonóide. Fonte: Nishiumi, 2011.....	4
Figura 2: Representação do aparato experimental da extração sólido-líquido	13
Figura 3: Curva de calibração para leitura de compostos fenólicos através do método de Folin-Ciocalteu.....	14
Figura 4: Curva de calibração para leitura de proteínas através do método de Bradford.....	16
Figura 5: Superfície de resposta da extração de fenólicos totais em relação ao solvente e temperatura	20
Figura 6: Superfície de resposta da extração de proteínas em relação ao solvente e à temperatura	23

Lista de Tabelas

Tabela 1: Índices codificados do planejamento fatorial e respectivos valores avaliados	9
Tabela 2: Variáveis independentes planejadas para os experimentos.....	11
Tabela 3: Resultados dos experimentos de análise de estabilidade dos compostos fenólicos	17
Tabela 4: Resultados de teor de fenólicos totais e proteínas nos experimentos realizados.....	18
Tabela 5: Coeficientes dos parâmetros para o modelo extração de fenólicos e suas significâncias	19
Tabela 6: Coeficientes do modelo simplificado para <i>extração de</i> fenólicos.....	19
Tabela 7: Coeficientes dos parâmetros para o modelo de extração de proteínas e suas significâncias.....	21
Tabela 8: Coeficientes do modelo simplificado de extração de proteínas	22
Tabela 9: Valores ótimos para a extração de compostos fenólicos	24

1 Introdução

A noz pecã é uma fruta muito apreciada no mundo todo por suas características singulares. Apresenta textura e sabor agradáveis, além de sua praticidade, o que a qualifica como ótima opção para ser consumida como aperitivo ou como tira-gosto. Além do seu consumo *in natura* ser altamente difundido ainda é muito usada como complemento em bolos e doces, e, por ser uma oleaginosa, seu óleo pode ser utilizado como opção gourmet. Seu cultivo está presente em várias partes do mundo, com destaque para o sul da América do Norte. No Brasil, o sul do país se destaca, abrangendo boa parte da produção nacional. A boa receptibilidade da noz-pecã no mercado consumidor e sua alta versatilidade a qualificam como um mercado cada vez mais promissor e lucrativo.

A produção da torta de noz-pecã se dá através da retirada do óleo presente na noz. Caracteriza-se, portanto, como um subproduto da indústria de óleos. Apesar de ser considerado um resíduo na indústria, em sua composição consta uma série de elementos de alto valor agregado, como proteínas e compostos fenólicos.

Estudo realizado por Sarkis (2013) aponta a existência de elevados teores de compostos fenólicos presente na noz, muito superior se comparado à outras espécies similares como sementes de gergelim e girassol ou macadâmias. Esta característica qualifica a noz-pecã, e também a sua torta, como uma ótima fonte de compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos têm um valor importante na vida das pessoas. Presente em uma série de alimentos, atuam como um conservante natural, prolongando a vida útil dos alimentos prevenindo a rancidez. Além de conferirem propriedades importantes aos alimentos, ainda trazem benefícios para quem o consome, diminuindo o risco de uma série de doenças por se tratarem de antioxidantes naturais. Por apresentarem uma série de propriedades benéficas ao ser-humano, o isolamento de compostos fenólicos para utilização em outros alimentos é uma boa alternativa ao uso de antioxidantes sintéticos.

Enquanto o isolamento dos compostos fenólicos é interessante para ser utilizado em outras ocasiões por conta dos benefícios de suas propriedades, sua presença na torta de noz-pecã não traz benefícios, uma vez que dificulta a absorção das proteínas

por animais quando a torta é usada como complemento nutricional na composição de ração animal.

O objetivo deste trabalho foi determinar as melhores condições para a obtenção de compostos fenólicos da torta de noz-pecã através do processo de extração sólido-líquido e utilizando ferramentas estatísticas. Foram avaliados a influência da temperatura e da composição do solvente, composto por uma mistura de etanol e água. Foi construída uma superfície de resposta para avaliar os resultados e determinar o ponto ótimo.

2 Revisão Bibliográfica

Neste capítulo será abordado uma revisão de literatura acerca dos principais temas importantes deste trabalho. Ele está dividido em 3 subseções que versam sobre as características da noz-pecã, fundamentos sobre os compostos fenólicos e sobre a extração sólido-líquido.

2.1 Noz-pecã

A noqueira-pecã (*Carya illinoensis* K.) é uma planta originária do sul da América do Norte (Thompson e Grauke, 1991), conhecida por dar origem à noz-pecã, fruto muito apreciado no mundo todo pelo seu sabor, aroma e textura agradáveis. A noz possui uma versatilidade muito grande, sendo utilizada no preparo de diversos pratos, onde pode assumir tanto o papel principal como servir de complemento. A noz-pecã pode ser consumida na forma de farinha ou *in natura*.

Pertencente à família Juglandaceae, a noqueira-pecã se adapta a regiões de clima frio com chuvas bem distribuídas. No Brasil, as regiões sul e sudeste se destacam por abrigar a grande maioria das plantações desta cultura. Entre os estados, o Rio Grande do Sul detém o protagonismo no plantio da noz-pecã, sendo a cidade de Cachoeira do Sul o principal centro de cultivo do fruto. Nestas regiões a noz-pecã é difundida principalmente por agricultores familiares, mas a produção em larga escala para fins industriais também obtém espaço (EMATER-RS, 2017).

Assim como outras nozes com características oleaginosas, a noz-pecã possui um alto teor energético, em 100 g de sua polpa comestível encontra-se cerca de 700 kcal. Além disso, é uma importante fonte de minerais, como fósforo, magnésio e potássio, e vitaminas, principalmente a vitamina A e vitamina E. Ainda, cerca de 15% de sua composição é constituída de carboidratos e 10% de fibras. O teor de proteínas varia em torno de 10% (Venkatachalam e Sathe, 2006).

Por ser constituída majoritariamente por lipídios, a noz-pecã se torna uma excelente fonte de óleo comercial. A produção da iguaria tendo como matéria-prima a noz ainda é pequena se comparado a óleos fabricados com outras oleaginosas já consolidadas no meio, porém, o óleo de pecã surge como um produto de mercado promissor. O óleo apresenta sabor diferenciado, podendo ser difundido em categorias *gourmet*.

Além da produção de óleos, a comercialização e o consumo da noz-pecã industrialmente se dá na forma *in natura*, ou em versões trituradas e em farelo. O número de empresas que a utilizam como matéria-prima em suas operações ainda é baixo se comparado a outras culturas oleaginosas como o amendoim ou o girassol. Entretanto, o interesse no plantio da noqueira-pecã vem crescendo ao longo dos anos, especialmente no sul do Brasil, impulsionado pela alta dos preços no mercado internacional de frutos secos e condições climáticas favoráveis (Rovani & Wollmann, 2018). Este crescimento se deve pela conscientização dos benefícios da noz-pecã à saúde, recomendada por médicos e nutricionistas, e pelo consumo emergente em países como a China (Zhang, Peng et al, 2015).

Dados da EMATER/RS de 2017 apontam que a safra desta cultura no Rio Grande do Sul foi de aproximadamente 2500 mil hectares, número que não atende a demanda nacional e internacional crescente. Portanto, o plantio de noz-pecã tem uma promissora tendência de expansão ao longo dos próximos anos.

2.2 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos, tema de estudo deste trabalho, possuem um anel aromático em conjunto com um ou mais grupos hidroxila. A estrutura de suas moléculas pode apresentar uma simples molécula fenólica ou complexas cadeias poliméricas de alta massa molar. A variedade dessas moléculas é enorme, apenas uma categoria, como os flavonoides, pode apresentar cerca de oito mil compostos fenólicos diferentes. A Figura 1 apresenta a estrutura genérica de um flavonóide, importante classe de compostos fenólicos.

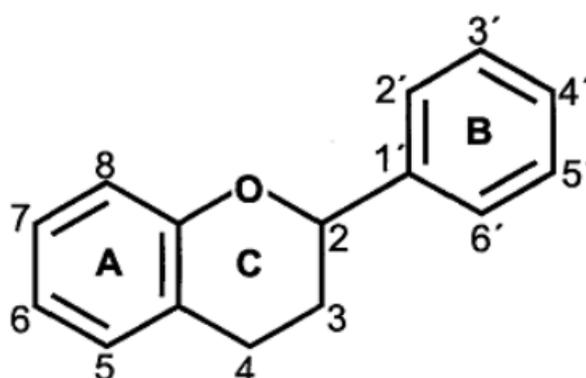


Figura 1: Estrutura genérica de um flavonóide. Fonte: Nishiumi, 2011.

A principal característica funcional dos compostos fenólicos é sua alta atividade antioxidante, isto é, estes compostos doam elétrons para radicais livres, impedindo-o de participar de outras reações. O poder oxidativo da molécula depende muito do arranjo de sua estrutura, principalmente da posição em que os grupos hidroxilas estão dispostos ao longo da molécula e da natureza das substituições no anel aromático (Shahidi, Naczk et al, 1992).

A característica antioxidante dos compostos fenólicos faz desta classe de substâncias importantes aliados na prevenção das mais diversas doenças. Esses compostos apresentam propriedades fisiológicas importantes, como efeitos antialérgicos, antiarterogênicos, antiinflamatórios, antimicrobianos, antivirais, antitrombóticos, cardioprotetores e vasodilatadores. O consumo de compostos fenólicos pode estar relacionado à diminuição do risco de doenças, como disfunções do coração, diabetes e até mesmo o câncer (Shahidi, Naczk et al, 1992; Balasundram, Sundram et al, 2005; Nishiumi, 2011).

Além das propriedades fisiológicas importantes e indispensáveis ao organismo, os compostos fenólicos ainda exercem a ação de prolongar a vida útil dos alimentos, combatendo o desenvolvimento da rancidez oxidativa, retardando a formação de compostos oxidativos tóxicos e mantendo sua qualidade nutricional (Shahidi, Naczk et al, 1992).

Existem diversos métodos para controlar a rancidez dos alimentos e prolongar a sua vida útil. A rancidez é causada pela oxidação lipídica em alimentos que contém óleos e gorduras. Devido a preocupações em relação a segurança dos alimentos e a limitação do uso de antioxidantes sintéticos, o interesse na obtenção de antioxidantes naturais comestíveis, especialmente quando provenientes de fontes residuais de alimentos, vem em crescente expansão (Moure et al, 2001).

Em estudo realizado, Sarkis (2014) concluiu que a noz-pecã apresenta teores de compostos fenólicos totais superior a outras espécies de sementes e nozes analisadas - como sementes de girassol, linhaça e gergelim - e nozes do tipo amêndoa, avelã e macadâmia. A pecã chega a apresentar índice de compostos fenólicos 10 vezes superior a outras culturas analisadas, sendo considerada uma excelente fonte de compostos fenólicos.

Entre a grande variedade de compostos fenólicos encontrados na noz-pecã, destacam-se a presença de ácido gálico, ácido elágico, ácido protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzoico, proantocianidinas, prodelfinidinas, epicatequina-3-o-galato, além dos

mais comumente encontrados como flavan-3-ols, catequina e epicatequina (Haminiuk, Maciel et al, 2012).

2.3 Extração Sólido-Líquido

Para que as benéficas propriedades fisiológicas dos compostos fenólicos possam ser utilizadas de maneira eficiente, é necessário um método de extração adequado que não danifique sua natureza e estabilidade. A extração sólido-líquido cumpre esse papel, sendo a técnica clássica utilizada para separar um ou mais componentes contidos em uma fase sólida através da utilização de um solvente.

Diversos fatores atuam na extração sólido-líquido alterando sua eficiência. Podemos obter um meio de extração de maior ou menor qualidade variando características como a polaridade do solvente, o tempo de exposição da fase sólida ao solvente, a temperatura, o pH, razão solvente/soluto e o tamanho das partículas sólidas (Cacace e Mazza, 2003).

Ao encontro de obter as melhores condições para a extração, a escolha do solvente mais adequado passa por questões físicas inerentes ao solvente em si, como miscibilidade, densidade, estabilidade e toxicidade, ou econômicas, como custo, fácil obtenção e manuseio, armazenamento e capacidade de reutilização (Cacace e Mazza, 2003).

Existem diversos estudos na literatura que avaliam as condições de operação de extrações sólido-líquido para a obtenção de compostos fenólicos. Mohsen e Ammar (2009), analisando os efeitos da polaridade de diferentes tipos de solvente, concluíram que o etanol, seguido do metanol e da água, foram os solventes mais eficientes na extração de compostos fenólicos de farelo de milho, comparado a acetona, hexano, clorofórmio, butanol, éter de petróleo e cloreto de magnésio. Matthaus (2002) mostra que a quantidade de compostos fenólicos totais extraídos de sementes oleaginosas aumenta com a polaridade do solvente.

Durante a extração a concentração de cada composto ligado à fase sólida atinge o estado de equilíbrio com a concentração dissolvida no solvente. O equilíbrio é explicitado pela constante de distribuição de equilíbrio (constante de partição), função da concentração em equilíbrio na fase seca (Equação 1), descrita a seguir:

$$m = \frac{y_e}{x_e} \quad (1)$$

onde m é a constante de partição, y_e é a fração mássica de um determinado composto no extrato e x_e é a fração mássica de um determinado composto na parcela seca (Schwartzberg & Chao, 1982). Quanto maior o valor da constante de partição, maior é a interação do composto em questão com o solvente e, portanto, mais dissolvido ele será.

A temperatura é outro fator bastante importante na extração. Segundo Cacace & Massa (2002), o aumento da temperatura favorece a extração devido ao aumento da solubilidade dos compostos fenólicos no solvente e, ainda, o aumento da taxa de extração, reduzindo o tempo do processo. Outros trabalhos também reforçam que o rendimento da extração é favorecido com o aumento da temperatura (Liyana-Pathirana e Shahidi, 2005; Silva et al, 2011). As conclusões são suportadas pela Equação 2, de Stokes-Einstein, que indica que a difusividade mássica entre a fase sólida e líquida é diretamente proporcional à temperatura da extração:

$$D \propto \frac{T}{\eta} \quad (2)$$

onde D é a difusividade mássica, T é a temperatura de extração e η é a viscosidade dinâmica da solução. Além da temperatura, a composição do solvente utilizado também é capaz de alterar a difusividade mássica do meio, por meio de efeitos na viscosidade (Haidekker, 2005).

Entretanto, em termos práticos, a linearidade da relação entre a temperatura e o rendimento da extração de fenólicos totais não é ilimitada. Schwartzberg & Chao (1982) afirmam que temperaturas altas, de 55 a 75 °C, podem promover a degradação dos compostos, reduzindo a obtenção de compostos fenólicos no extrato. Com isso, é necessária a análise, para cada composto fenólico de interesse, das condições térmicas ideais para a realização da extração visando o máximo de aproveitamento.

3 Metodologia

O seguinte capítulo tem por objetivo descrever os materiais utilizados na extração dos compostos fenólicos da torta de noz-pecã e elucidar a metodologia empregada tanto no planejamento e execução das extrações e análises realizadas, como na obtenção dos resultados.

Todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados nas dependências do Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) e na Central Analítica do Departamento de Engenharia Química, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre.

3.1 Material Utilizado

A torta de noz-pecã utilizada como matéria-prima nos experimentos foi cedida pela empresa Vital Atman, indústria de produtos alimentícios situada em São José do Rio Preto, estado de São Paulo. A Vital Atman é uma indústria de óleos comestíveis onde se destaca a produção de óleos provenientes de abóbora, girassol, linhaça e nozes, entre outros. A produção do óleo acontece por meio da prensagem a frio, sendo a torta remanescente um subproduto do processo.

Antes de ser utilizada no processo de extração, a torta foi desengordurada utilizando hexano como solvente, com o objetivo de dar a ela característica de pó, podendo ser chamada de farinha de noz-pecã. Esse processo preliminar aumenta o tempo de vida útil da matéria prima, uma vez que são eliminadas as espécies lipídicas de sua composição, que são responsáveis pela oxidação do produto. A remoção de óleo torna mais fácil a utilização da torta pois elimina a turbidez dos extratos.

3.2 Análise de Estabilidade

Primeiramente, antecedendo o planejamento dos experimentos visando a otimização da extração de compostos fenólicos, foi realizado um estudo para verificar a estabilidade dos compostos fenólicos no extrato armazenado sob refrigeração.

Uma extração sólido-líquido foi realizada, em duplicata, com auxílio de um agitador magnético Fisatom 753A e um condensador. O experimento foi realizado em temperatura ambiente e utilizou solvente constituído por 50% etanol e 50% água por 20 minutos. Após a extração, o extrato foi filtrado a vácuo e armazenado sob refrigeração.

Esta extração preliminar teve como objetivo gerar um extrato rico em compostos fenólicos, nos mesmos moldes que seriam realizados no experimento de otimização, afim de realizar as análises espectrofotométricas para obtenção do teor de compostos fenólicos totais do extrato obtido.

As análises para obtenção do teor de compostos fenólicos totais presentes no extrato foram realizadas em triplicata logo após a extração ter sido realizada e nos 4 dias seguintes à extração. As análises foram realizadas utilizando o método de Folin-Ciocalteu, que será descrito posteriormente. Os resultados foram comparados no decorrer da semana, diariamente, para identificar se os compostos fenólicos presentes no extrato continuaram estáveis, demonstrando que o armazenamento sob refrigeração poderia ser utilizado nos extratos sem comprometer a qualidade da análise, ou se, por algum motivo, não mantinham suas características, impossibilitando o armazenamento nestas condições que foram impostas.

3.3 *Planejamento Fatorial dos Experimentos*

Para avaliar as melhores condições de extração dos compostos fenólicos na torta de noz-pecã foi realizado o planejamento fatorial chamado delineamento composto central rotacional (DCCR), o planejamento deste trabalho consistiu num fatorial 2^2 incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 5 repetições do ponto central. O trabalho totalizou, portanto, 13 ensaios experimentais.

Verificou-se a relevância de duas variáveis independentes: a temperatura de extração (x_1) e a concentração do etanol no solvente constituído por etanol e água (x_2). Foram avaliadas também duas variáveis dependentes, as variáveis de resposta, o teor de compostos fenólicos totais (y_1) e o teor de proteínas (y_2) presentes na torta da noz-pecã. As variáveis independentes foram analisadas em 5 níveis que estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1: Índices codificados do planejamento fatorial e respectivos valores avaliados

Índice	-1,41	-1	0	1	1,41
Temperatura (x_1)	25	34	55	76	85
% EtOH (x_2)	0	12	40	69	80

As variáveis independentes foram escolhidas por serem as duas principais razões que causam alterações na qualidade das extrações. A avaliação da temperatura ótima faz-se necessária em razão da possibilidade de altas temperaturas facilitarem a extração dos compostos presentes nas matrizes celulares e, por outro lado, causarem a degradação dos compostos de interesse. A avaliação da composição ótima do solvente etanol/água se dá pelo fato de serem dois solventes com polaridades diferentes, apresentando, portanto, a capacidade de extrair compostos também de polaridades diferentes. Avalia-se, portanto, a concentração do solvente para encontrar o ponto ótimo de polaridade onde ocorre a maior extração de compostos de interesse em determinado caso específico.

O objetivo do planejamento estatístico apresentado é obter o modelo polinomial de segunda ordem que represente a variação do teor de composto de interesse extraído em relação às variáveis independentes, modelando os dados experimentais obtidos.

$$y_i = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_1^2 + \beta_4x_2^2 + \beta_5x_1x_2 \quad (3)$$

Na Equação 4 apresentada, y_i é a variável de resposta, x_1 e x_2 são as variáveis independentes e β_n são os coeficientes de regressão que devem ser estimados. Os parâmetros do modelo e as superfícies de resposta foram obtidos usando o software Statistica, (StatSoft 1984-2011). Uma vez modelada a função, avalia-se os termos que não apresentaram significância, estes são, portanto, excluídos, gerando um modelo reduzido, mais simples e prático, que busca ser fiel aos dados experimentais.

Após a função ser obtida, foi calculado o erro médio do modelo através da equação 4:

$$E (\%) = \sum_n \frac{|y_{exp} - y_{pred}|}{y_{exp}} \cdot \frac{100}{n} \quad (4)$$

A equação x explicita o erro médio do modelo que foi construído, representado por E em percentual, y_{exp} são os dados experimentais obtidos em laboratório, y_{pred} são os dados obtidos através do modelo e n é o número de experimentos realizados. A análise da fidelidade do modelo obtido também se deu com a observação do R^2 do modelo.

3.4 Extração dos Compostos Fenólicos

A presente seção procura descrever o passo-a-passo seguido na extração sólido-líquido realizada para a obtenção da melhor condição para extração de compostos fenólicos totais e as condições impostas nos experimentos.

A temperatura e a concentração de etanol do solvente empregado nas extrações estão apresentadas na Tabela 2 e seguiram a determinação do planejamento experimental descrito anteriormente.

Tabela 2: Variáveis independentes planejadas para os experimentos

Ensaio	T (cod)	%EtOH (cod)	T (°C)	%EtOH
1	-1	-1	34	12
2	1	-1	76	12
3	-1	1	34	69
4	1	1	76	69
5	-1,41	0	25	40
6	1,41	0	85	40
7	0	-1,41	55	0
8	0	1,41	55	80
9	0	0	55	40
10	0	0	55	40
11	0	0	55	40
12	0	0	55	40
13	0	0	55	40

O aparato experimental foi composto por um banho de aquecimento Polystat, um banho de resfriamento Lauda Alpha RA12, um agitador magnético Fisatom 753A, um condensador e uma célula de vidro encamisada onde ocorreu a extração. A disposição dos equipamentos está mostrada na Figura 2.

Antes de iniciar a extração, os banhos de aquecimento e de resfriamento foram ligados e esperou-se o tempo necessário para que as temperaturas definidas fossem alcançadas. A temperatura do banho de aquecimento seguia o planejamento

experimental, exposto na Tabela 2, e esse banho estava conectado à célula de vidro encamisada. A temperatura do banho de resfriamento foi ajustada para 10°C em todos os experimentos e o banho foi conectado ao condensador. O condensador foi acoplado na parte superior da célula de extração para evitar a perda de amostra por evaporação do solvente durante o experimento.

As extrações ocorreram sempre em um volume de 50 mL de solvente. As concentrações de etanol no solvente utilizado nos experimentos estão expostas na Tabela 2. Antes de iniciar o experimento, o solvente foi colocado na célula de extração com o aparato experimental já montado e os banhos com as temperaturas corretas. Fixou-se o tempo de espera de 2 minutos do solvente em contato com o banho antes de receber a parcela de noz-pecã para que o solvente alcançasse a mesma temperatura do banho quente, a temperatura de operação.

Aproximadamente 1 g de torta de noz-pecã foi pesado na balança analítica e as variações em torno do peso foram anotadas para posterior correção nos resultados. A amostra pesada foi inserida na célula de extração e o agitador magnético foi ligado, iniciando-se o tempo de extração de 20 minutos. Passado o tempo planejado, o meio reacional foi coletado em um tubo falcon e filtrado à vácuo em papel filtro para remover os sólidos suspensos remanescentes. O extrato obtido na filtração foi coletado em um balão volumétrico de 50 mL e seu volume foi acertado completando o balão com solvente de mesma composição do utilizado na extração. O extrato final com volume ajustado foi despejado em outro tubo falcon, vedado com filme parafínico e armazenado sob refrigeração até o momento das análises.



Figura 2: Representação do aparato experimental da extração sólido-líquido

3.5 *Análise de Fenólicos e Proteínas*

Após a obtenção dos extratos ricos em compostos fenólicos, realizou-se procedimentos para determinação da quantidade exata de compostos fenólicos presentes nos extratos obtidos nas diversas condições do experimento.

Primeiramente realizou-se a determinação dos compostos fenólicos totais nas amostras. Para isso, foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu que tem como princípio de atuação a reação de oxidação do reagente de Folin-Ciocalteu com os compostos fenólicos presentes na amostra em ambiente alcalino. O reagente de Folin-Ciocalteu é constituído por uma mistura de complexos metálicos dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstínico.

O procedimento de preparo das amostras para posterior análise inicia-se diluindo o extrato rico em fenólicos em água destilada na proporção 1:10. A diluição de 1:10 foi escolhida e se mostrou eficiente uma vez que os resultados lidos no espectrofotômetro que serão mostrados no decorrer deste trabalho ficaram dentro da faixa de calibração aceitável. Uma vez diluído, misturou-se 200 μL da amostra em 850 μL de água destilada, adicionou-se ainda 100 μL do reagente de Folin-Ciocalteu agitando em vortex, e, em um período subsequente de 30 segundos a 8 minutos, adicionou-se 850 μL de solução de carbonato de cálcio 7%, agitando novamente em vortex. A solução foi deixada em repouso por uma hora protegida da luz e em

temperatura ambiente para posterior leitura de absorvância em espectrofotômetro UV-vis no comprimento de onda 765 nm. Para o preparo do branco necessário para as análises no espectrofotômetro foi utilizado o solvente empregado nas extrações de cada amostra analisada.

Após leitura dos resultados no espectrofotômetro de UV-vis, o teor de compostos fenólicos é obtido com o auxílio de uma curva de calibração construída com solução de ácido gálico com concentração conhecida, ajustando uma reta relacionando a absorvância lida no espectrofotômetro e a concentração de fenólicos no extrato em mg/L.

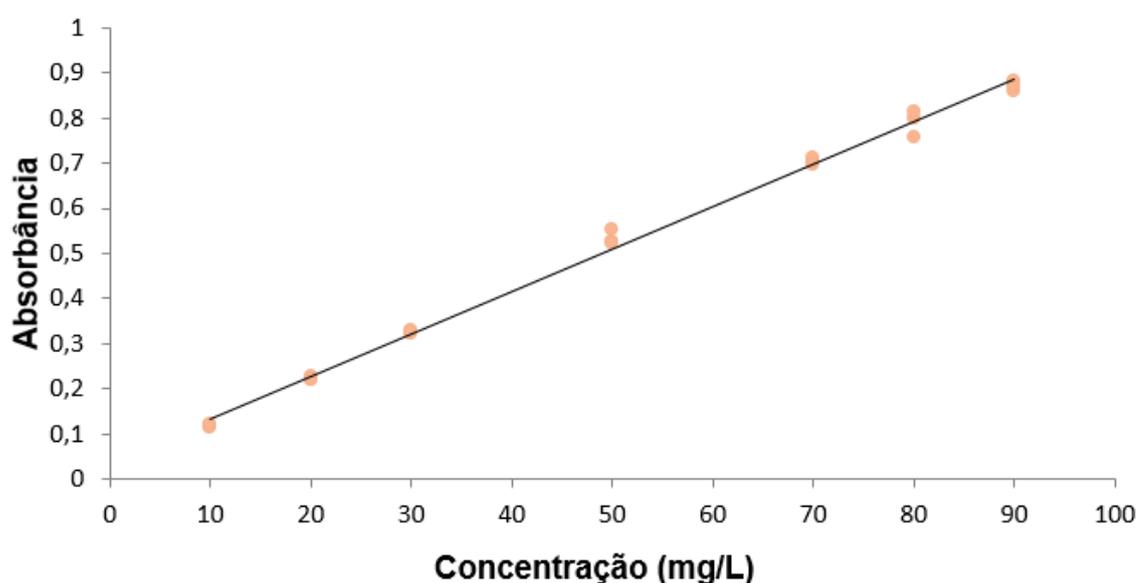


Figura 3: Curva de calibração para leitura de compostos fenólicos através do método de Folin-Ciocalteu

A equação de reta obtida, com $R^2 = 0,996$, através da regressão linear da curva de calibração para a obtenção dos resultados de teor de compostos fenólicos totais é apresentada na Equação 5.

$$y = 0,0094x + 0,0379 \quad (5)$$

Na sequência, também foi realizada a determinação da quantidade total de proteínas presente no extrato utilizando o método de Bradford. Faz-se necessário esta segunda análise pois o método de Folin-Ciocalteu é sensível também à outras espécies redutoras presentes na solução. Portanto, o teor de proteínas total foi determinado com o objetivo de desconsiderar a interferência das mesmas na análise de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu.

O método de Bradford consiste na interação entre seu reagente principal, o corante *Coomassie brilliant blue* BG-250, com macromoléculas de proteínas presentes no meio que contém aminoácidos de cadeias laterais ou aromáticas. O produto resultante no meio reacional absorve a luz em 595 nm, possibilitando a quantificação dos compostos por meio do espectrofotômetro UV-vis.

O reagente de Bradford é obtido dissolvendo 100 mg do corante azul brilhante BG-250 em 25 mL de etanol 95%, adicionando posteriormente, em sequência, 700 mL de água destilada e 100 mL de ácido fosfórico 85%, por fim, completando o volume total de 1L em balão volumétrico com água destilada. O reagente de Bradford pode ser armazenado sob refrigeração por até um mês e foi, portanto, utilizado durante todo o período dos experimentos.

As amostras para definição de proteínas foram feitas misturando 0,1 mL do extrato com 5 mL do reagente de Bradford, agitando em vortex logo em seguida e deixando em repouso por 10 minutos antes de realizar a leitura de absorbância no espectrofotômetro UV-vis no comprimento de onda de 595 nm. Também foram preparadas duas amostras de branco, para uso no espectrofotômetro, misturando 0,1 mL do solvente utilizado para a extração da amostra em questão com 5 mL do reagente de Bradford.

Para obter o teor total de proteínas presentes na amostra foi usada uma curva de calibração. A curva de calibração para a obtenção de proteínas também foi construída com amostras de concentração conhecidas e variadas ajustando a reta que relaciona a absorbância obtida no espectrofotômetro com o teor de proteínas presentes na amostra em mg/L.

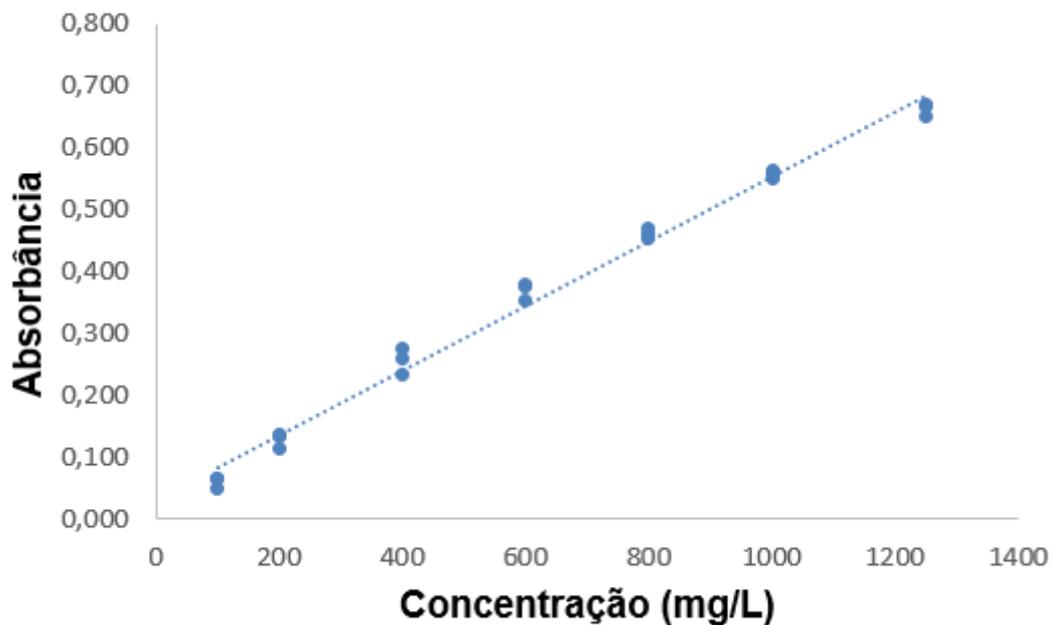


Figura 4: Curva de calibração para leitura de proteínas através do método de Bradford

A equação de reta obtida, ($R^2 = 0,9905$) através da regressão linear da curva de calibração para a obtenção dos resultados de teor de proteínas totais presentes nos extratos está representada na Equação 6.

$$y = 0,0005x + 0,0304 \quad (6)$$

4 Resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados dos experimentos indicados na metodologia a fim de otimizar os parâmetros para a extração de compostos fenólicos da torta de noz-pecã.

4.1 *Teste de Estabilidade*

O teste preliminar realizado para avaliar a estabilidade dos compostos fenólicos nos extratos armazenados sob refrigeração foi realizado como mencionado na seção 3.2 da metodologia.

As análises realizadas logo após a extração encontraram o teor de compostos fenólicos no extrato de 22 ± 4 mg EAG/g de torta de noz-pecã. Os resultados das demais análises estão dispostas na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados dos experimentos de análise de estabilidade dos compostos fenólicos

Dia	Concentração (mg EAG/g)	Erro (%)
1	22 ± 4	20
2	22 ± 3	14
3	24 ± 3	11
4	25 ± 3	12
5	24 ± 1	6

4.2 *Resultados da Extração*

Os experimentos realizados para obtenção do ponto ótimo de extração de compostos fenólicos da torta de noz-pecã seguiram a metodologia descrita na seção 3.4 e os resultados completos estão explicitados na Tabela 4 juntamente com o desvio padrão de cada análise.

Tabela 4: Resultados de teor de fenólicos totais e proteínas nos experimentos realizados

Ensaio	T (°C)	%EtOH	Fenólicos (mg EAG/g)	Proteínas (mg BSA/g)
1	34	12	13,9 ±0,4	4,1 ±0,8
2	76	12	18,7 ±0,8	6,6 ±0,3
3	34	69	27,5 ±0,3	16,8 ±0,1
4	76	69	21,8 ±1,0	11,8 ±0,3
5	25	40	26,7 ±0,8	19,9 ±2,1
6	85	40	30,2 ±0,5	16,3 ±4,4
7	55	0	9,4 ±0,8	0,7 ±0,3
8	55	80	20,5 ±0,0	9,3 ±0,9
9	55	40	29,8 ±0,4	13,9 ±1,4
10	55	40	27,2 ±0,2	17,4 ±0,5
11	55	40	26,0 ±0,4	18,7 ±1,7
12	55	40	25,4 ±1,7	16,2 ±1,8
13	55	40	26,5 ±1,1	14,9 ±1,8

Percebe-se que a faixa de resultados do teor de fenólicos totais por grama de torta de noz-pecã ficou entre 9,4 e 30,2 mg/g, enquanto que o teor de proteínas variou entre 0,7 a 19,9 mg/g. O erro experimental foi avaliado com base na variação dos resultados dos pontos centrais (ensaios de 9 a 13, realizados nas mesmas condições) e foi de 6,4% nos fenólicos e 11,6% nas proteínas. A variação nos teores de proteínas e fenólicos obtidos confirma a importância das variáveis independentes escolhidas.

4.3 Análise dos Compostos Fenólicos

Com os dados apresentados na Tabela 4 é possível dar sequência às análises estatísticas. Primeiramente, considerando a variável de resposta y_1 , teor de fenólicos totais na torta de noz-pecã.

A primeira análise a ser feita utiliza o valor do coeficiente p que indica se a influência da variável independente é significativa sobre a variável de resposta em estudo. Adotando o intervalo de confiança de 95%, consideramos, portanto, que as

variáveis independentes que possuem valores de coeficiente p menores que 0,05 tem efeito significativo no modelo obtido, variáveis independentes com valores p maiores que 0,05 devem ser retirados da análise, simplificando o modelo, pois não possuem efeitos significativos.

Os coeficientes p , assim como os parâmetros encontrados para o modelo, estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5: Coeficientes dos parâmetros para o modelo extração de fenólicos e suas significâncias

Parâmetro	Efeito	Coeficiente	P
β_0	Independente	27,0	0,0000
β_1	T (linear)	1,0	0,4136
β_2	%Et (linear)	8,1	0,0002
β_3	T (quadrático)	0,9	0,5062
β_4	%Et (quadrático)	-12,7	0,0000
β_5	Interação T e %Et	-5,3	0,01520

Pode ser observado que apenas os efeitos lineares e quadráticos do solvente e o efeito da interação solvente/temperatura são significativos para o modelo. Com o resultado, as variáveis linear e quadrática da temperatura foram desconsideradas para gerar novo modelo apenas com as variáveis significativas. Os resultados do modelo simplificado estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Coeficientes do modelo simplificado para *extração de* fenólicos

Parâmetro	Efeito	Coeficiente	P
β_0	Independente	27,3	0,000000
β_2	%Et (linear)	8,1	0,000047
β_4	%Et (quadrático)	-12,8	0,000002
β_5	Interação T e %Et	-5,3	0,008708

Portanto, a equação final que representa o teor de fenólicos total na torta de noz-pecã está representada na Equação 7.

$$y_1 = 27,3 + 8,1x_2 - 12,8x_2^2 - 5,3x_1x_2 \quad (7)$$

A equação 7, que possui $R^2 = 0,937$, representando o teor de compostos fenólicos totais extraídos em 1 g de torta de noz-pecã, representado por y_1 , onde x_1 é a variável codificada da temperatura e x_2 é a variável codificada da concentração de etanol no solvente. Com base no modelo obtido, é possível desenhar a superfície de resposta do modelo, representada na Figura 5. O erro médio do modelo, que é calculado segundo equação 4, comparando os resultados experimentais com os resultados preditos pelo modelo obtido, foi de 4%.

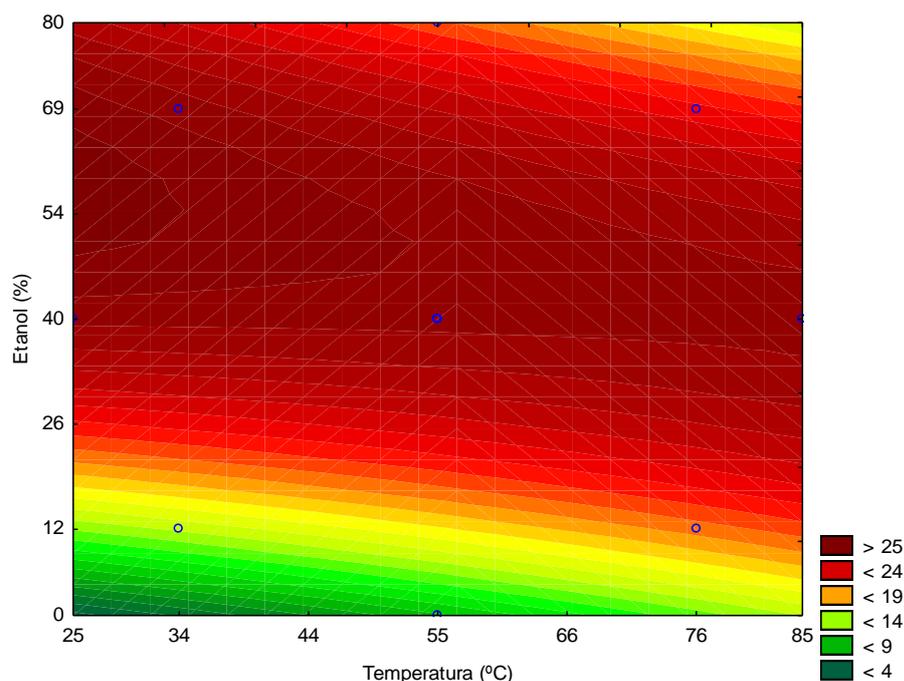


Figura 5: Superfície de resposta da extração de fenólicos totais em relação ao solvente e temperatura

Através da superfície de resposta encontrada, pode-se perceber, assim como indica o estudo dos termos significativos, que existe uma faixa de % de etanol no solvente onde a extração dos compostos fenólicos é mais efetiva. Esta faixa de maior extração, considerando apenas o efeito do solvente, se situa entre 40 e 50% de Etanol na mistura. Por outro lado, os efeitos da temperatura não são tão visíveis. Como

mostrado na Tabela 6, o efeito da temperatura isolado não é significativo para o modelo, entretanto, podemos perceber que seu efeito é significativo quando ligado ao efeito do solvente, uma vez que para um mesmo valor de % de etanol, o teor de compostos fenólicos extraídos aumenta conforme a temperatura aumenta.

4.4 Análise de Proteínas

Da mesma forma que realizado com os resultados dos compostos fenólicos, os resultados da extração de proteínas foram tratados com a finalidade de obter uma superfície de resposta e um modelo matemático que represente a influência das variáveis independentes. Os parâmetros encontrados na análise preliminar estão expostos na Tabela 7.

Tabela 7: Coeficientes dos parâmetros para o modelo de extração de proteínas e suas significâncias

Parâmetro	Efeito	Coeficiente	P
β_0	Independente	16,2	0,0000
β_1	T (linear)	-1,9	0,2010
β_2	%Et (linear)	7,5	0,0008
β_3	T (quadrático)	1,0	0,4983
β_4	%Et (quadrático)	-12,1	0,0001
β_5	Interação T e %Et	-3,7	0,0891

Observando que também se encontram valores não significativos, onde o valor de p é maior que 0,05, uma nova análise resumida é necessária a fim de obter um modelo simplificado e sucinto.

A nova análise final está representada na Tabela 8 que apresenta apenas os parâmetros significativos para o modelo de extração de proteínas. Observa-se que, além dos parâmetros linear e quadrático para o solvente e o independente que apresentam número p muito menor que 0,05, o parâmetro que representa o efeito entre a interação entre a temperatura e o solvente apresenta o número p muito próximo a 0,05. A análise do R^2 do modelo, igual a 0,856, relativamente baixo, e a

proximidade do número p do limite proposto foram determinantes para incluir também este parâmetro no modelo.

Tabela 8: Coeficientes do modelo simplificado de extração de proteínas

Parâmetro	Efeito	Coefficiente	P
β_0	Independente	16,6	0,000000
β_2	%Et (linear)	7,5	0,000689
β_4	%Et (quadrático)	-12,3	0,000023
β_5	Interação T e %Et	-3,7	0,085072

Portanto, com os resultados mostrados, encontra-se o modelo que representa a extração de proteínas com base na variação das variáveis independentes. O modelo está apresentado na Equação 8, que apresenta $R^2 = 0,856$.

$$y_2 = 16,6 + 7,5x_2 - 12,3x_2^2 - 3,7x_1x_2 \quad (8)$$

Finalmente, com a equação obtida, a superfície de resposta que a representa pode ser construída e está apresentada através da Figura 6. Analisando a superfície de resposta gerada conclui-se que ela muito se assemelha com a superfície de resposta dos fenólicos, apresentando as mesmas variações que a superfície dos fenólicos apresentou, isto é, faixa ótima de etanol no solvente entre 45% e 55% e contribuição positiva da temperatura no termo conjunto com o solvente.

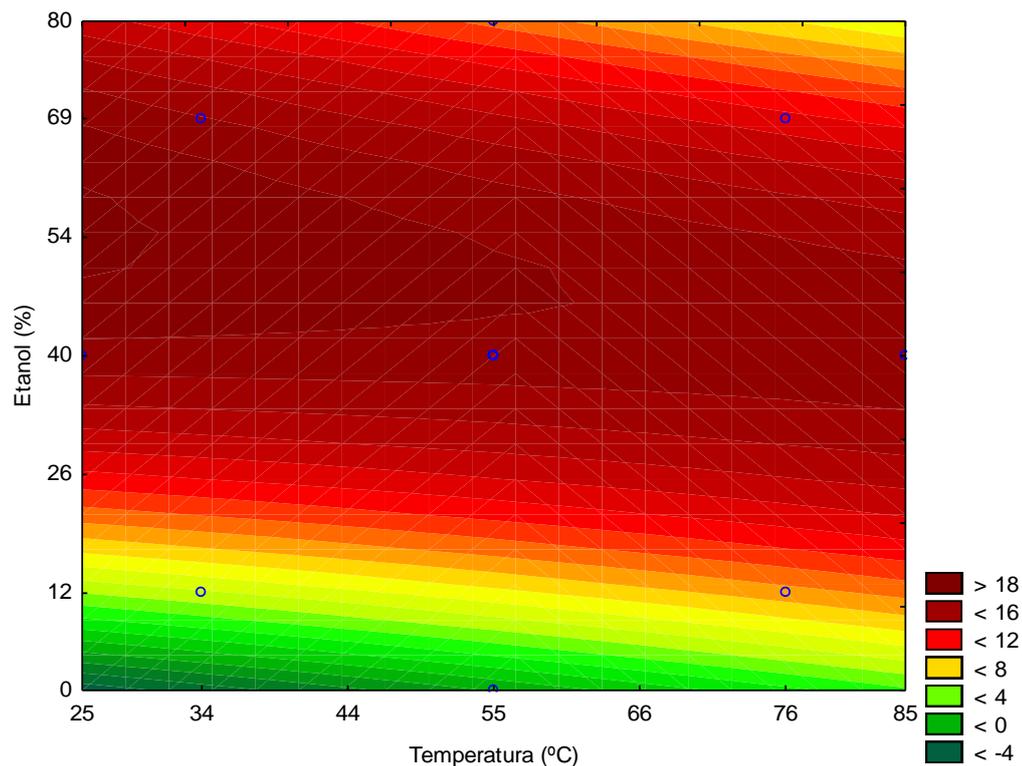


Figura 6: Superfície de resposta da extração de proteínas em relação ao solvente e à temperatura

4.5 Ponto Ótimo de Extração

Com todos os resultados das análises já mostrados precisamos encontrar o ponto ótimo da extração de fenólicos da noz-pecã. Comparando as análises realizadas do teor de fenólicos totais e do teor de proteínas apresentadas na Figura 5 e na Figura 6, observamos que a faixa de condições onde são extraídos o maior teor de fenólico é muito similar à faixa de condições onde são extraídos o maior teor de proteínas. Este é um resultado ruim para as pretensões do trabalho pois não evidencia um ponto onde possivelmente poderia haver maior extração de fenólicos sem haver extração de proteínas. Portanto, o estudo da otimização seguiu para encontrar o ponto ótimo onde há a maior extração de compostos fenólicos, mesmo que haja também a extração de proteínas.

Desta forma, considerando que não há distinção entre a extração de fenólicos e proteínas, para obter o melhor ponto de operação é realizado a derivada em relação à variável independente x_2 , concentração do etanol no solvente, do modelo obtido para o teor de fenólicos totais, equação 7.

A derivada obtida para indicação do ponto ótimo está apresentada na Equação 9.

$$y'_1 = 8,1 - 25,6x_2 - 5,3x_1 \quad (9)$$

Através da Equação 9, percebe-se que o ponto ótimo é uma função do solvente e também da temperatura. Igualando a derivada a zero, encontramos a equação do ponto ótimo de composição de solvente em função da temperatura, apresentado na Equação 10:

$$x_2 = 0,3164 - 0,207x_1 \quad (10)$$

A Tabela 9 apresenta a substituição dos valores codificados de temperatura utilizados na extração na Equação 10 e o teor de solvente encontrado nestas condições.

Tabela 9: Valores ótimos para a extração de compostos fenólicos

T codificado (x1)	%Et codificado (x2)	%Et real	Teor de fenólicos (y1) [mg/g]
-1,41	0,61	57	34,96
-1	0,52	55	33,33
0	0,32	49	28,58
1	0,11	43	22,73
1,41	0,02	41	20,01

Conclui-se pela Tabela 9 que a maior extração de compostos fenólicos ocorre a baixas temperaturas e considerável parcela de etanol no solvente, em torno de 60%.

5 Conclusões

O presente trabalho teve como objetivo encontrar a condição ótima da extração sólido-líquido de compostos fenólicos utilizando a temperatura e a composição do solvente etanol/água como variáveis independentes. O ponto ótimo foi obtido através da construção de superfícies de resposta do teor de fenólicos e proteínas obtidos na extração oriundas do planejamento experimental delineamento composto central rotacional 2² (DCCR).

Os teores de fenólicos variaram entre 9,4 e 30,2 mg EAG/g de torta e o erro experimental medido no ponto central foi de 9,4%. Os teores de proteínas variaram entre 0,7 e 19,9 mg DAG/g de torta e o erro experimental medido no ponto central foi de 11,6%.

Com os modelos e as superfícies de resposta obtidos concluiu-se que a maior extração dos compostos fenólicos e das proteínas se dá na mesma na mesma faixa de composição de solvente (entre 40 e 60%) e a temperatura favorece a extração quando o solvente é pobre em etanol, mas prejudica a extração quando a faixa de etanol no solvente é considerável.

O ponto ótimo obtido para a extração de compostos fenólicos da torta de noz-pecã é uma função da temperatura. Maiores teores de fenólicos foram encontrados em temperaturas menores quando a concentração de etanol no solvente é considerável, sendo, portanto, o ponto ótimo encontrado de 57% de etanol no solvente quando a extração ocorre em 25 °C.

Referências

- BALASUNDRAM, Nagendran; SUNDRAM, Kalyana; SAMMAN, Samir. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, n. 4, p. 379-389, 2003.
- DA SILVA, Bianca Ferreira et al. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. **Chemosphere**, v. 85, n. 8, p. 1331-1339, 2011.
- HAIDEKKER, M. A. et al. Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes. **Bioorganic chemistry**, v. 33, n. 6, p. 415-425, 2005.
- HAMINIUK, Charles WI et al. Phenolic compounds in fruits—an overview. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023-2044, 2012.
- LIYANA-PATHIRANA, Chandrika; SHAHIDI, Fereidoon. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food chemistry**, v. 93, n. 1, p. 47-56, 2005.
- MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3444-3452, 2002.
- MOHSEN, Sobhy M.; AMMAR, Abdalla SM. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. **Food chemistry**, v. 112, n. 3, p. 595-598, 2009.

MOURE, Andrés et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.

NISHIUMI, Shin et al. Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. **Front Biosci**, v. 3, n. 3, p. 1332-1362, 2011.

ROVANI, Franciele Francisca Marmentini; WOLLMANN, Cássio Arthur. Análise sazonal e anual dos requisitos climáticos do cultivo da noqueira pecã (*Carya illinoensis*) no Rio Grande do Sul. **GEOUSP: Espaço e Tempo (Online)**, v. 22, n. 1, p. 191-209, 2018.

SARKIS, Júlia R. et al. Evaluation of the phenolic content and antioxidant activity of different seed and nut cakes from the edible oil industry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 10, p. 1773-1782, 2014.

SCHWARTZBERG, Henry G.; CHAO, R. Y. Solute diffusivities in leaching processes. **Food Technology**, v. 36, n. 2, p. 73-86, 1982.

SHAHIDI, Fereidoon; NACZK, Marian. An overview of the phenolics of canola and rapeseed: chemical, sensory and nutritional significance. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, n. 9, p. 917-924, 1992.

THOMPSON, Tommy E.; GRAUKE, Larry J. Pecans and other hickories (*Carya*). **Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops 290**, p. 839-906, 1991.

VILLARREAL-LOZOYA, Jose E.; LOMBARDINI, Leonardo; CISNEROS-ZEVALLOS, Luis. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1241-1249, 2007.

VENKATACHALAM, Mahesh; SATHE, Shridhar K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4705-4714, 2006.

ZHANG, Rui; PENG, Fangren; LI, Yongrong. Pecan production in China. **Scientia Horticulturae**, v. 197, p. 719-727, 2015.